

⑩ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift
⑪ DE 3626953 A1

⑤ Int. Cl. 4:
B01D 13/02
C 02 F 1/46

⑲ Aktenzeichen: P 36 26 953.0
⑳ Anmeldetag: 8. 8. 86
㉑ Offenlegungstag: 5. 3. 87



DE 3626953 A1

⑤ // C07K 3/26

⑲ Unionspriorität: ③ ③ ③
03.09.85 DD WP B 01 D/280 270 8

⑦① Anmelder:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, DDR
4020 Halle, DD

⑦② Vertreter:
Nindel, H., Dr.rer.nat., DDR 4020 Halle

⑦③ Erfinder:
Schneider, Jochen, Dr.rer.nat.; Krauß,
Gerd-Joachim, Dr.rer.nat.; Danew, Petko, Dr.med.,
DDR 4020 Halle, DD

⑤ Verfahren und Apparatur zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparatur zur Fraktionierung von Gemischen aus elektrisch geladenen Makromolekülen verschiedener Größe aus flüssigen Gemischen, die z. B. die Proteinfractionierung- und -anreicherung aus biologischen Flüssigkeiten gestattet. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Fraktionierung elektrisch geladener Moleküle mit Hilfe einer Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration zu erreichen, wobei die Anzahl der Fraktionen und die Größe der Moleküle zu einer jeweils engepaßten Konfiguration der Apparatur führen sollen. Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß eine Kolonne thermostatierter Kammern durch Ultrafiltrationsmembranen voneinander getrennt, von einem elektrischen Gleichstrom durchflossen wird, wodurch sich die Membranen mit den Fraktionen belegen. Durch Umkehr der Polarität des elektrischen Feldes werden die Moleküle von den Membranen abgelöst und können dann aus den Kammern problemlos isoliert werden.

Mögliche Einsatzgebiete der Erfindung sind die Vorfraktionierung von Enzymaktivitäten, die Gewinnung großer Proteinmengen für biotechnologische Zwecke, die Gewinnung von Enzymen als Therapeutika und andere.

DE 3626953 A1

1. Verfahren zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen durch Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration gekennzeichnet dadurch, daß ein Molekülgemisch beim Durchgang durch ein System von Ultrafiltrationsmembranen gestaffelter Porengröße in Fraktionen getrennt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß für die Durchführung der Fraktionierung eine Primär-Kammer (A) mit dem Molekülgemisch und die Kammern (B) und (C) mit Pufferlösung gefüllt werden.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnet dadurch, daß alle Kammern in Parallelbetrieb an einen Thermostaten angeschlossen werden.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 2 und 3 gekennzeichnet dadurch, daß nach Füllung der Kammern an die Elektroden 4 eine elektrische Gleichspannung angelegt wird.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 4 gekennzeichnet dadurch, daß nach Eintreten der Strom- bzw. Spannungssättigung vor der Entleerung der Kammer B, die an den Elektroden 4 anliegende Gleichspannung kurzzeitig umgepolt wird.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 2 bis 5 gekennzeichnet dadurch, daß die Entleerung der Kammern in Abhängigkeit von der Einstellung eines spezifischen Potentialverlaufs innerhalb einzelner Kammern steuerbar ist.
7. Apparat zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 gekennzeichnet dadurch, daß eine variable Anzahl von thermostatisierbaren Kammern (ABC) durch Ultrafiltrationsmembranen (1) voneinander getrennt hintereinander vertikal oder horizontal eine Kolonne bildend, angeordnet sind und mit einer elektrischen Gleichspannungsquelle in Verbindung stehen.
8. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß jede Kammer (A, B, C) doppelwandig ist und je einen Zu- und Abfluß für Kühlfüssigkeit und für den eigentlichen Kammerinhalt besitzt.
9. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) und (C) mit Membranen (1) geeigneter Porengröße mit Hilfe geeigneter Kupplungsmechanismen ausgerüstet sind.
10. Apparat nach Anspruch 7 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (A) und (C) mit je einer Elektrode (4) geeigneter geometrischer Gestalt für das Anlegen einer möglichst homogenen Gleichspannung ausgerüstet sind.
11. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 9 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) je eine in radialer Richtung durch die Kammerwände geführte Meßelektrode (5) besitzen.
12. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 11 gekennzeichnet dadurch, daß die Kolonne durch geeignete Verbindung der für die jeweils benötigte Anzahl von Einzelkammern (B) aufgebaut ist.
13. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 12 gekennzeichnet dadurch, daß die Kammern (B) und (C) mit Membranen (1) ausgerüstet sind, die in der Kolonne nach abnehmender Porengröße angeordnet sind.
14. Apparat nach den Ansprüchen 7 bis 13 ge-

ennzeichnet dadurch, daß die Kammer (C) zur kontinuierlichen Spülung mit Pufferlösung mit einem externen Vorratsgefäß in Verbindung steht.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Apparat zur elektrokinetischen Ultrafiltration von Makromolekülen und erlaubt die Fraktionierung von Makromolekülgemischen durch eine Kombination von Freier Elektrophorese und Ultrafiltration.

Aus der Entwicklung der Biotechnologie und modernen Forschung ergibt sich in zunehmenden Maße der Bedarf an Apparaten zur leistungsfähigen Isolierung biologisch aktiver Proteine für folgende Einsatzgebiete:

— Vorfractionierung zur weiteren Hochreinigung und Charakterisierung von Enzymaktivitäten (biochem. Grundlagenforschung)

— Gewinnung großer Proteinmengen für biotechnologische Zwecke:

— Enzyme für die Trägerfixierung

— Ecto-enzyme aus mikrobiellen Kulturen zum Abbau von Zellstrukturen (Zellwandabbau-Protoplastierung, Proteinbereitstellung)

— Enzyme aus Zellhomogenaten (z. B. pflanzliche Zellkulturen) für die Biotransformation organischer Stoffe zu Arzneimitteln

— Enzyme für die Feinchemikalienbereitstellung (z. B. aus Recombanten)

— Ausgewählte biotechnologische Einsatzgebiete: Stärkeverarbeitung, Bauindustrie, Textilindustrie (Amylasen), Waschmittel, Käseprodukte, Lederindustrie (Proteasen), Frucht- und Gemüsesaftproduktion (Pektinasen, Amylasen), Backwarenherstellung (Amylasen, Proteasen) u. a.

— Fleischaufbereitung

— Gewinnung von Enzymen als Therapeutika, z. B. Applikation zur verbesserten Arzneimittelresorption; Kompensation der Insuffizienz bestimmter Organfunktionen; Behandlung von Erkrankungen

— Vorreinigung von Proteinen für immunologische Untersuchungen (z. B. in der Differentialdiagnostik)

— Abtrennung von Proteinen aus biotechnologischen "Abwässern", z. B. aus der Antibiotika-Produktion; Papierherstellung u. a.

— Der Apparat ist grundsätzlich auch zur Fraktionierung anderer Makromoleküle, wie Muco-Polysaccharide und Nukleinsäuren geeignet.

Es sind verschiedene Verfahren der elektrophoretischen Trennung von Polyelektrolyten bekannt. Dabei wird die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine genutzt, die von der Größe der Moleküladdung sowie von der Größe und Form der einzelnen Teilchen abhängt. Darüber hinaus beeinflussen auch die Eigenschaften des Trägermediums die Wanderungsgeschwindigkeit.

Bei der Freien Elektrophorese bewegen sich kolloidal gelöste Teilchen in der Untersuchungslösung unter elektrischer Feldwirkung. Dementsprechend sind die jeweils verwendeten Geräte sowie der Ablauf der elektrokinetischen Vorgänge voneinander verschieden. Typische Beispiele sind Patente zur Ablenkungselektrophorese (US-PS 40 61 560, DE-PS 15 98 109, 16 98 181).

Für die Ultrafiltration von Makromolekülen stehen verschiedene kommerziell angebotene Geräte zur Verfügung, die die Abtrennung von Biopolymeren unter Druck über Filtermembranen erlauben. Effektive Möglichkeiten zur Entsalzung von Proteinen

schaft die Elektrodialyse, wobei Ionenaustauscher-
membranen, teilweise in Kombination mit elektroneu-
tralen Ultrafiltrationsmembranen, verwendet werden,
deren Widerstände die Wirtschaftlichkeit der Kammern
bestimmen. Die bekannten technischen Lösungen erlau-
ben lediglich eine Grobfractionierung von großen (Prote-
inen) und kleinen (anorgan. Ionen) elektrischen La-
dungsträgern.

In dem US-PS 28 01 962 und 30 70 318 wird eine Pro-
teinanreicherung durch dialytisch parallel geschaltete
Kammern erreicht, wobei die angelegte Gleichspan-
nung lediglich die Trennung beschleunigt. Der Grad der
Konzentration ist kontinuierlich schwer verfolgbare.
Es ist sehr zweifelhaft, ob die Apparatur einen kontinu-
ierlichen Langzeitbetrieb erlaubt. Die verwendeten Pa-
pierfilter bzw. Dialysemembranen verstopfen sehr
schnell. In den Patenten werden keine Reinigungsmög-
lichkeiten beschrieben. Die Apparaturen erlauben keine
Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe.

In der US-PS 38 44 926 wird ein Elektrodialysator mit
rotierender Außenkammer und zahlreichen Kammern
um die Mittelachse des zylindrischen Gerätes beschrie-
ben, der Enzymmixturen entsalzt.

Neuere technische Lösungen ordnen mehrere Trenn-
kammern mit Dialysemembranen an, wobei das elektr-
sche Feld senkrecht zum Flüssigkeitsstrom angelegt
wird (US-PS 40 43 895; 41 23 342; 42 76 140; EP
00 29 540).

Die technische Lösung im Patent JP 59 26 105 bein-
hältet in einem Gleichspannungsfeld ein System aus auf-
einanderfolgenden Kammern, die durch vergleichsweise
dicke Gelmembranen voneinander getrennt sind. Eine
Fraktionierung nach Molekülgröße ist nicht möglich.
Die Gelmembranen zeigen hohe Adsorption für die zu
trennenden Moleküle und damit ist mit hohem Verlust
des Trenngutes zu rechnen. Durch aufwendige laufende
Spülung der Einzelkammern muß in den Einzelkam-
mern ein für das ampholytische Verhalten der Moleküle
diffiziles Ionenmilieu geschaffen werden. Die Puffer-
tröge enthalten Lösungen unterschiedlicher pH-Werte.

In der DE-PS 33 37 669 (Biotrap) wird ein Elektro-
konzentrator beschrieben, der in vorhandene Elektro-
phoreseapparaturen eingesetzt werden muß. Das Ma-
kromolekülgemisch wird bei Passage durch nur eine
Membran nicht fraktioniert. Das in DE-PS 33 37 668
beschriebene Verfahren beschreibt lediglich eine Elu-
nierung von Gemischen aus Gelen, nicht aber eine Fra-
ktionierung.

Ziel der Erfindung ist es, eine Apparatur zu realisie-
ren, die die Fraktionierung elektrisch geladener Ma-
kromoleküle aus flüssigen Gemischen, z. B. die Proteinfrak-
tionierung und -anreicherung aus biologischen Flüssig-
keiten, gestattet.

Der Ablauf der Fraktionierung soll diskontinuierlich
beliebig oft wiederholbar und automatisierungsfähig sein,
so daß sowohl analytische wie biotechnologische Aufga-
ben erfüllt werden können.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die Fra-
ktionierung elektrisch geladener Makromoleküle mit Hil-
fe einer Kombination von Freier Elektrophorese und
Ultrafiltration zu erreichen, wobei die Anzahl der Fra-
ktionen und die Größe der Moleküle zu einer jeweils
angepaßten Konfiguration der Apparatur führen sollen.

Weiterhin sollen durch geeigneten Aufbau der Appa-
ratur und die Wahl des Regimes der äußeren Parameter
eine oftmals Wiederholung des Fraktionierungsprozes-
ses möglich und darüber hinaus nur ein minimaler An-
teil von Verschleißteilen Bestandteil der Apparatur

sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst,
daß eine Kolonne von thermostatisierten Kammern ge-
bildet wird, deren jede durch eine auswechselbare Ul-
trafiltrationsmembran einseitig abgeschlossen ist. Die
Ausrüstung der aneinanderzureihenden Kammern er-
folgt in Anpassung an die jeweils zu fraktionierenden
Moleküle mit Membranen entsprechend gestaffelter
Porengröße. Je nach Aufgabenstellung (z. B. Aufkon-
zentrieren) werden Kammern gleicher und/oder un-
terschiedlicher Volumina eingesetzt. Am Anfang und am
Ende der Kolonne befinden sich je eine Kammer mit
einer Elektrode zur Erzeugung eines elektrischen Fel-
des über die gesamte Länge der Kolonne.

Jede der Kammern besitzt einen separaten Zu- und
Abfluß und eine separate Thermostatisierung, so daß
die Kolonne aus einer variablen Anzahl von Kammern
nach dem Baukastenprinzip zusammengesetzt werden
kann.

In Funktion werden die einzelnen Kammern im Paral-
lelbetrieb an einen Thermostaten angeschlossen, alle
Kammern außer der ersten werden mit Pufferlösung
gefüllt und die erste Kammer wird mit dem zu frak-
tionierenden Gemisch beschickt. Nachdem die Kolonne
auf diese Weise betriebsbereit ist, wird an die Elektro-
den der ersten und letzten Kammer eine elektrische
Gleichspannung so angelegt, daß die Makromoleküle
des Gemischs in Richtung Kolonne zu wandern begin-
nen. Beim Durchlaufen der Kolonne treffen die Molekü-
le auf das nach abnehmender Porengröße gestaffelte
System der Ultrafiltrationsmembranen und belegen die-
se als Fraktion in der Reihenfolge abnehmender Mo-
lekülgrößen.

Die Folgekammern nach der Primärkammer können
durch kontinuierliche Beschickung der Primärkammer
bis auf ein optimales Maß mit Fraktionen gefüllt wer-
den, dabei tritt die aus der Drucktechnik bekannte Kon-
zentrationsepolarisation nicht auf.

Wenn in zu fraktionierenden Gemisch Salzkonen
enthalten sind, wandern diese je nach Polarität im Sinne der
Elektrodialyse in die Endkammer und können dort ge-
gebenenfalls kontinuierlich oder zyklisch ausgespült
werden. Weiterhin entstehen in der Primärkammer und
in der Endkammer Elektrolysegase, für deren Abtrans-
port bei der konstruktiven Lösung gesorgt werden muß
(im Ausführungsbeispiel nicht dargestellt).

Wenn die Fraktionierung vollständig stattgefunden
hat, was am Erreichen eines Sättigungswertes der Elek-
trodenspannung bei Konstantstrombetrieb bzw. des
Elektrodenstromes bei Konstantleistungsbetrieb oder
an der Einstellung eines spezifischen Potentialverlaufs
innerhalb einzelner Kammern erkennbar ist, werden die
Kammern entleert, wobei auch durch Umpolung des
elektrischen Feldes die fraktionierten Moleküle von den
Membranen abgelöst werden können.

Danach kann der geschilderte Vorgang von vorn begin-
nen. Gegebenenfalls läßt sich der gesamte periodische
Ablauf automatisieren.

Für die kontrollierende Messung ist jede einzelne Kam-
mer mit einer Meßelektrode ausgerüstet.

Die Erfindung soll nachstehend an einem Ausfüh-
rungsbeispiel näher erläutert werden.

Fig. 1 zeigt die Kolonne für die fraktionierende elek-
trokinetische Ultrafiltration schematisch. Die einzelnen
Kammern sind durch Ultrafiltrationsmembranen 1 ge-
staffelter Porengröße getrennt. Jede der Kammern stellt
ein zylindrisches Doppelmattegefäß dar. Zwischen äu-
ßerer Wandung 2 und innerer Wandung 3 befindet sich

das Volumen mit Zu- und Abflußstutzen für den Durchlauf der Thermostat-Flüssigkeit, wobei alle Kammern parallel geschaltet sind.

Alle Kammern besitzen weiterhin einen Zu- und Abflußstutzen zum Innenraum, wobei der Kammer A mit dem zu fraktionierenden Primär-Gemisch, die Kammern B und C mit Pufferlösung gefüllt werden. Nach Beendigung der Fraktionierung verlassen die Kammer A ein sekundäres, d. h. das um die Fraktion reduzierte Primärgemisch, die Kammern B die Fraktionen 1, 2, ..., n und die Kammer C ein Rest-Gemisch von Puffer und Molekülen, die alle Membranen durchlaufen haben. Die Kammern A und C sind mit internen Elektroden 4 geeigneter geometrischer Gestalt für das Anlegen eines möglichst homogenen elektrischen Feldes an die Kolonne ausgerüstet. Die Kammern B besitzen je eine Elektrode 5 für die Messung des elektrischen Kammerpotentials.

Fig. 2 zeigt die Kammern A, B und C im Schnitt. Die Verbindung der Kammern untereinander geschieht durch Schraubengewinde und zwischengelegte Dichterringe 6. Die Ultrafiltrationsmembranen 1 werden durch Schraubenringe 7 auf die Dichtfläche des Kammeroberteils 8 gepreßt und sind somit leicht auswechselbar.

25

30

35

40

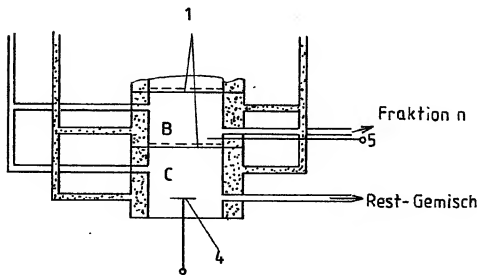
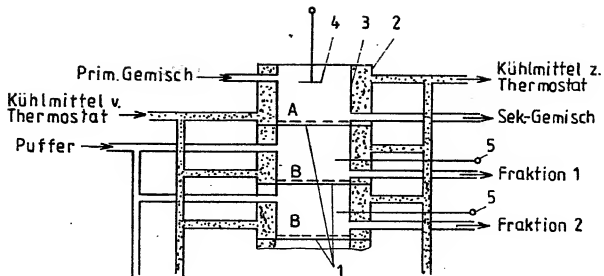
45

50

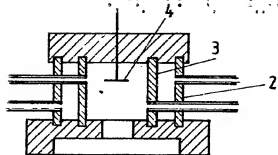
55

60

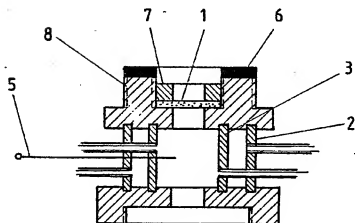
65



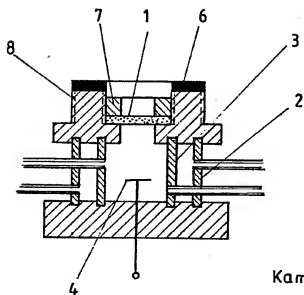
Figur 1



Kammer A



Kammer B



Kammer C

Figur 2